

## BUNDEREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



50669772  
REC'D 19 SEP 2000

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

10/069772

**Aktenzeichen:** 199 41 609.5

**Anmeldetag:** 01. September 1999

**Anmelder/Inhaber:** Institut für Pflanzenbiochemie,  
Halle, Saale/DE

**Bezeichnung:** Fettsäure-Desaturase-Gen aus Pflanzen

**IPC:** C 07 K, A 61 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 27. Juli 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Agurke

## Patentansprüche

1. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit  
5 Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1  
dargestellten Sequenz,
- 10 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des  
degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1  
dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,
- 15 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäure-  
sequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2  
dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens  
75 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß  
die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich  
reduziert ist.
- 20 2. Aminosäuresequenz codiert durch eine Nukleinsäuresequenz  
gemäß Anspruch 1.
3. Aminosäuresequenz nach Anspruch 2, codiert durch die in  
25 SEQ ID NO: 1 dargestellte Sequenz.
4. Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine Nukleinsäuresequenz  
gemäß Anspruch 1, wobei die Nukleinsäuresequenz mit einem  
oder mehreren Regulationssignalen verknüpft ist.
- 30 5. Vektor enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1  
oder ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4.
6. Organismus enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz  
35 gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt  
gemäß Anspruch 4.
7. Organismus nach Anspruch 6, wobei es sich bei dem Organismus  
um eine Pflanze, einen Mikroorganismus oder ein Tier handelt.
- 40 8. Transgene Pflanze enthaltend eine funktionelle oder nicht  
funktionelle Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder ein  
funktionelles oder nicht funktionelles Nukleinsäurekonstrukt  
gemäß Anspruch 4.

45

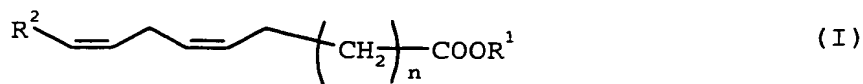
1064/99 UP/gb 01.09.1999

## 2

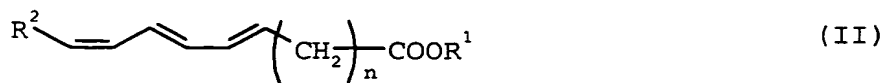
9. Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4 in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert und die im Öl enthaltenden Fettsäuren freisetzt.
10. Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4 in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert.
11. Verfahren zur Herstellung von gesättigten Fettsäuren dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine nicht funktionelle Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein nicht funktionelles Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4 in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert und die im Öl enthaltenden Fettsäuren freisetzt.
12. Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine nicht funktionelle Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder mindestens ein nicht funktionelles Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4 in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert.
13. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die ungesättigten Fettsäuren einen erhöhten Gehalt an Calendulasäure aufweisen.
14. Verfahren nach den Ansprüchen 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Organismus um eine Pflanze oder einen Mikroorganismus handelt.
15. Ungesättigte Fettsäuren hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 9.
16. Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 10.

## 3

17. Gesättigte Fettsäuren hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 11.
18. Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten Fettsäuren hergestellt nach einem Verfahren gemäß Anspruch 12.
19. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder eines Nukleinsäurekonstrukts gemäß Anspruch 4 zur Herstellung von transgenen Pflanzen.
20. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 oder eines Fragmentes davon zur Isolierung einer genomischen Sequenz über Homologiescreening.
21. Verwendung von ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren gemäß Anspruch 15 oder 17 oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren gemäß Anspruch 16 oder 18 zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Tierfutter, Kosmetika oder Pharmazeutika.
22. Enzym, das eine Fettsäure der allgemeinen Struktur I,

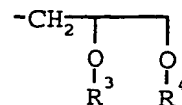


die zwei durch eine Methylengruppe voneinander getrennte Doppelbindungen aufweist, zu einer dreifach ungesättigten Fettsäure der allgemeinen Struktur II



umsetzt, wobei die drei Doppelbindungen der Fettsäure in Konjugation sind und wobei die Substituenten und Variablen in den Verbindungen der allgemeinen Struktur I und II folgende Bedeutung haben:

$R^1$  = Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, ungesättigte oder gesättigte, verzweigtes oder unverzweigtes  $C_1$ - $C_{10}$ -Alkyl-,



4

$R^2$  = substituiertes oder unsubstituiertes, ungesättigtes oder gesättigtes  $C_1$ - $C_9$ -Alkyl-

5  $R^3$  und  $R^4$  unabhängig voneinander Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, gesättigtes oder ungesättigtes, verzweigtes oder unverzweigtes  $C_1$ - $C_{22}$ -Alkylcarbonyl- oder Phospho-,

n = 1 bis 14

10

15

20

25

30

35

40

45

## Fettsäure-Desaturase-Gen aus Pflanzen

## Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren.

10

Die Erfindung betrifft weiterhin eine Nukleinsäuresequenz; ein Nukleinsäurekonstrukt, einen Vektor und Organismen enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz bzw. ein Nukleinsäurekonstrukt. Außerdem betrifft die Erfindung gesättigte oder unge-

15 sättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren und deren Verwendung.

Fettsäuren und Triglyceride haben eine Vielzahl von Anwendungen  
20 in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich. Je nachdem ob es sich um freie gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren oder um Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet, so werden  
25 beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren Babynahrung zur Erhöhung des Nährwertes zugesetzt. Hauptsächlich werden die verschiedenen Fettsäuren und Triglyceride aus Mikroorganismen wie Mortierella oder aus Öl-produzierenden Pflanzen wie Soja, Raps, Sonnenblume und weiteren gewonnen, wobei sie in der Regel in Form  
30 ihrer Triacylglyceride anfallen. Sie werden aber auch vorteilhaft aus Tieren wie Fischen gewonnen. Die freien Fettsäuren werden vorteilhaft durch Verseifung hergestellt.

Je nach Anwendungszweck sind Öle mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren bevorzugt, so sind z.B. in der humanen Ernährung  
35 Lipide mit ungesättigten Fettsäuren speziell mehrfach ungesättigten Fettsäuren bevorzugt, da sie einen positiven Einfluß auf den Cholesterinspiegel im Blut und damit auf die Möglichkeit einer Herzerkrankung haben. Sie finden in verschiedenen diätischen  
40 Lebensmitteln oder Medikamenten Anwendung.

Besonders wertvolle und gesuchte ungesättigte Fettsäuren sind die sogenannten konjugierten ungesättigten Fettsäuren wie die konjugierte Linolsäure. Für konjugierte Fettsäuren sind eine Reihe po-  
45 sitiver Effekte nachgewiesen worden, so reduziert die Verabreichung von konjugierter Linolsäure das Körperfett in Mensch und Tier bzw. erhöht den Futterumsatz in Körpergewicht bei Tieren

## 2

(WO 94/16690, WO 96/06605, WO 97/46230, WO 97/46118). Durch Gabe von konjugierter Linolsäure lassen sich auch beispielsweise Allergien (WO 97/32008) oder Krebs positiv (Banni et al., Carcinogenesis, Vol. 20, 1999: 1019 - 1024, Thompson et al., Cancer, Res., Vol. 57, 1997: 5067 - 5072) beeinflussen.

Die chemische Herstellung konjugierter Fettsäuren beispielsweise Calendulasäure oder konjugierter Linolsäure wird in US 3,356,699 und US 4,164,505 beschrieben. Calendulasäure kommt natürlich  
10 in *Calendula officinalis* vor (Ul'chenko et al., Chemistry of Natural Compounds, 34, 1998: 272 - 274). Konjugierte Linolsäure findet sich beispielsweise in Rindfleisch (Chin et al., Journal of Food Composition and Analysis, 5, 1992: 185 - 197). Biochemische Untersuchungen zur Synthese von Calendulasäure sind in Crombie et al., J. Chem. Soc. Chem. Commun., 15, 1984: 953 - 955 und  
15 J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1, 1985: 2425 - 2434 zu finden.

Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften hat es in der Vergangenheit nicht an Ansätzen gefehlt Gene, die an der Synthese von Fettsäuren bzw. Triglyceriden beteiligt sind, für die Herstellung von Ölen in verschiedenen Organismen mit geändertem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren verfügbar zu machen. So wird in WO 91/13972 und seinem US-Äquivalent eine  $\Delta$ -9-Desaturase beschrieben. In WO 93/11245 wird eine  $\Delta$ -15-Desaturase; in  
20 WO 94/11516 wird eine  $\Delta$ -12-Desaturase beansprucht.  $\Delta$ -6-Desaturasen werden in WO 93/06712 und WO 96/21022 beschrieben. Weitere Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stuckey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144 - 20149, Wada et al.,  
25 Nature 347, 1990: 200-203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 649 - 659 beschrieben. Die biochemische Charakterisierung der verschiedenen Desaturasen ist jedoch bisher nur unzureichend erfolgt, da die Enzyme als membrangebundene Proteine nur sehr schwer zu isolieren und charakterisieren sind (McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141 - 12147, Wang et al., Plant  
30 Physiol. Biochem., 26, 1988: 777 - 792).

In Hefen konnte sowohl eine Verschiebung des Fettsäurespektrums zu ungesättigten Fettsäuren hin als auch eine Steigerung der Produktivität nachgewiesen werden (siehe Huang et al., Lipids 34,  
40 1999: 649 - 659, Napier et al., Biochem. J., Vol. 330, 1998: 611 - 614). Die Expression der verschiedenen Desaturasen in transgenen Pflanzen zeigte allerdings nicht den gewünschten Erfolg. Eine Verschiebung des Fettsäurespektrums zu ungesättigten Fettsäuren hin konnte gezeigt werden, gleichzeitig zeigte sich  
45 aber, daß die Syntheseleistung der transgenen Pflanzen stark

## 3

nachließ, das heißt gegenüber den Ausgangspflanzen konnten nur geringere Mengen an Ölen isoliert werden.

Nach wie vor besteht daher ein großer Bedarf an neuen Genen, die  
5 für Enzyme kodieren, die an der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren beteiligt sind und es ermöglichen diese und speziell konjugierte ungesättigte Fettsäuren zu synthetisieren und in einem technischen Maßstab herzustellen.

10 Es bestand daher die Aufgabe weitere Desaturasen für die Synthese ungesättigter konjugierter Fettsäuren zur Verfügung zu stellen. Diese Aufgabe wurde durch eine isolierte Nukleinsäuresequenz gelöst, die für ein Polypeptid mit Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:

15

a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,

20 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,

25 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 75 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.

Unter Derivate(n) sind beispielsweise funktionelle Homologe des  
30 von SEQ ID NO: 1 kodierten Enzyms oder dessen enzymatischer Aktivität, das heißt Enzyme, die dieselben enzymatischen Reaktionen wie das von SEQ ID NO:1 kodierte Enzym katalysieren, zu verstehen. Diese Gene ermöglichen ebenfalls eine vorteilhafte Herstellung ungesättigter konjugierte Fettsäuren. Unter ungesättigten Fettsäuren sind im folgenden einfach und mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu verstehen, deren Doppelbindungen konjugiert oder nicht konjugiert sein können. Die in SEQ ID NO:1 genannte Sequenz kodiert für eine neue unbekannte Desaturase, die an der Synthese von Calendulasäure in Calendula officinalis beteiligt ist. Das  
35 Enzym setzt (9Z,12Z)Octadecadien/Linolsäure zu (8E,10E,12Z) Octadecakonjugutrien/Calendulasäure um. Im folgenden wird sie als Calendulasäure-Desaturase bezeichnet.  
40

Die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder Fragmente davon  
45 können vorteilhaft zur Isolierung weiterer genomischer Sequenzen über Homologiescreening verwendet werden.



## 4

Die genannten Derivate lassen sich beispielsweise aus anderen eukaryontischen Organismen wie Pflanzen wie *Calendula stellata*, *Osteospermum spinescens* oder *Osteospermum hyoseroides*, Algen, Protozoen wie Dinoflagellaten oder Pilze isolieren.

5

Weiterhin sind unter Derivaten bzw. funktionellen Derivaten der in SEQ ID No.1 genannten Sequenz beispielsweise Allelvarianten zu verstehen, die mindestens 75 % Homologie auf der abgeleiteten Aminosäureebene, bevorzugt mindestens 80 % Homologie, besonders  
10 bevorzugt mindestens 85 % Homologie, ganz besonders bevorzugt 90 % Homologie aufweisen. Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäurebereich berechnet. Es wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151 - 153). Die von der genannten Nukleinsäure  
15 abgeleitete Aminosäuresequenz ist Sequenz SEQ ID No.2 zu entnehmen. Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID No.1 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die enzymatische Aktivität der abgeleiteten synthetisierten Proteine erhalten bleibt.  
20

Solche DNA-Sequenzen lassen sich ausgehend von der in SEQ ID NO:1 beschriebenen DNA-Sequenz oder Teilen dieser Sequenzen, beispielsweise mit üblichen Hybridisierungsverfahren oder der PCR-  
25 Technik aus anderen Eukaryonten wie oben genannt isolieren. Diese DNA-Sequenzen hybridisieren unter Standardbedingungen mit den genannten Sequenzen. Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide beispielsweise der konservierten Bereiche, die über Vergleiche mit anderen Desaturasegenen in dem Fachmann bekannterweise ermittelt werden können, verwendet. Es können aber auch  
30 längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure: Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart DNA oder RNA für die Hybridisierung verwendet  
35 werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca 10 °C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge.

Unter Standardbedingungen sind beispielsweise je nach Nukleinsäure Temperaturen zwischen 42 und 58 °C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50% Formamid wie beispielsweise 42 °C in 5 x SSC, 50% Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20 °C bis 45 °C, bevorzugt zwischen etwa  
40 30 °C bis 45 °C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungs-  
45

## 5

- bedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30 °C bis 55 °C, bevorzugt zwischen etwa 45 °C bis 55 °C. Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielsweise kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.
- Weiterhin sind unter Derivaten Homologe der Sequenz SEQ ID No.1 beispielsweise eukaryontische Homologe, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz zu verstehen.
- Außerdem sind unter Homologe der Sequenz SEQ ID No.1 Derivate wie beispielsweise Promotorvarianten zu verstehen. Diese Varianten können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.
- Unter Derivaten sind auch vorteilhaft Varianten zu verstehen, deren Nukleotidsequenz im Bereich -1 bis -2000 vor dem Startkodon so verändert wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression verändert, bevorzugt erhöht wird. Weiterhin sind unter Derivaten auch Varianten zu verstehen, die am 3'-Ende verändert wurden.
- Für eine optimale Expression heterologer Gene in Organismen ist es vorteilhaft die Nukleinsäuresequenzen entsprechend des im Organismus verwendeten spezifischen "codon usage" zu verändern. Der "codon usage" läßt sich anhand von Computerauswertungen

## 6

anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.

Vorteilhaft kann das Calendulasäure-Desaturase-Gen im erfindungs-  
5 gemäßen Verfahren mit weiteren Genen der Fettsäurebiosynthese kombiniert werden.

Unter den erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen sind Proteine zu verstehen, die eine in SEQ ID NO: 2 dargestellte Aminosäure-  
10 sequenz oder eine daraus durch Substitution, Inversion, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäureresten erhältliche Sequenz enthalten, wobei die enzymatische Aktivität des in SEQ ID NO: 2 dargestellten Proteins erhalten bleibt bzw. nicht wesentlich reduziert wird. Unter nicht wesentlich reduziert sind  
15 alle Enzyme zu verstehen, die noch mindestens 10 %, bevorzugt 20 %, besonders bevorzugt 30 % der enzymatischen Aktivität des Ausgangsenzyms aufweisen. Dabei können beispielsweise bestimmte Aminosäuren durch solche mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften (Raumerfüllung, Basizität, Hydrophobizität etc.) ersetzt  
20 werden. Beispielsweise werden Argininreste gegen Lysinreste, Valinreste gegen Isoleucinreste oder Asparaginsäurereste gegen Glutaminsäurereste ausgetauscht. Es können aber auch ein oder mehrere Aminosäuren in ihrer Reihenfolge vertauscht, hinzugefügt oder entfernt werden, oder es können mehrere dieser Maßnahmen  
25 miteinander kombiniert werden.

Unter dem erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukt oder -fragment ist die in SEQ ID NO: 1 genannte Sequenz, Sequenzen, die sich als Ergebnis des genetischen Codes und/oder deren funktionellen oder  
30 nicht funktionellen Derivate zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression  
35 der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die  
40 Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Sequenz oder deren Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so  
45 mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch

eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Das Calendulasäure-Desaturase-Gen kann in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacI<sup>q</sup>-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-,  $\lambda$ -P<sub>R</sub>- oder im  $\lambda$ -P<sub>L</sub>-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SP02, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MF $\alpha$ , AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzenpromotoren wie CaMV/35S [Franck et al., Cell 21(1980) 285-294], PRP1 [Ward et al., Plant.Mol. Biol.22(1993)], SSU, OCS, lib4, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin-Promotor enthalten. Weitere vorteilhafte Pflanzenpromotoren sind beispielsweise ein durch Benzensulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2,397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO9321334) Promotor. Weitere Pflanzenpromotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel, der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445-245), der Promotor der Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase aus Glycine max (siehe auch Genbank Accession Nummer U87999) oder ein Nodien-spezifischen Promotor wie in EP 249676 beschrieben. Vorteilhaft sind insbesondere solche pflanzliche Promotoren, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Fettbiosynthese bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine samenspezifische Expression gewährleisten wie beispielsweise der usp-Promotor, der LEB4-Promotor, der Phaseolin-Promotor oder der Napin-Promotor.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Im Nukleinsäurefragment (= Genkonstrukt, Nukleinsäurekonstrukt) können wie oben beschrieben noch weitere Gene, die in die Organismen eingebracht werden sollen, enthalten sein. Diese Gene können unter getrennter Regulation oder unter der gleichen Regulationsregion wie das erfindungsgemäße Desaturase-Gen liegen. Bei diesen Genen handelt es sich beispielsweise um weitere Bio-

## 8

synthesegene vorteilhaft der Fettsäure- und Lipidbiosynthese, die eine gesteigerte Synthese ermöglichen. Beispielsweise seien die Gene für die  $\Delta 15$ -,  $\Delta 12$ -,  $\Delta 9$ -,  $\Delta 6$ -,  $\Delta 5$ -Desaturase, die verschiedenen Hydroxylasen, die Acetylenase, die Acyl-ACP-Thioesterasen, die  $\beta$ -Ketoacyl-ACP-Synthasen, die Acyltransferasen wie die Diacylglycerolacyltransferase, die Glycerol-3-phosphatacyltransferase oder die Lysophosphatidsäureacyltransferase oder die  $\beta$ -Ketoacyl-ACP-Reductasen genannt. Vorteilhaft werden die Desaturasegene im Nukleinsäurekonstrukt verwendet bevorzugt das  $\Delta 12$ -Desaturasegen.

10

Das Nukleinsäurefragment wird zur Expression in einem Wirtsorganismus beispielsweise einem Mikroorganismus wie einem Pilz oder einer Pflanze vorteilhafterweise in einen Vektor wie beispielsweise einem Plasmid, einem Phagen oder sonstiger DNA

15

inseriert, das eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Geeignete Plasmide sind beispielsweise in *E. coli* pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III<sup>113</sup>-B1,  $\lambda$ gt11 oder pBdCI, in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in *Bacillus* pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA77 oder pAJ667,

20

in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen 2 $\mu$ M, pAG-1, YE6, YE13 oder pEMBLye23 oder in Pflanzen pLGV23, pGHlac<sup>+</sup>, pBIN19, pAK2004, pVKH oder pDH51 oder Derivate der vorstehend genannten Plasmide. Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl

25

bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden. Geeignete pflanzliche Vektoren werden unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S.71-119

30

beschrieben.

Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren wie beispielsweise Phagen, Viren wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden. Bevorzugt ist eine chromosomale Replikation.

35

40

Der Vektor enthält vorteilhaft mindestens eine Kopie der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz und/oder des erfindungsgemäßen Nukleinsäurefragments.

45

Zur Erhöhung der Genkopienzahl können die Nukleinsäuresequenzen oder homologe Gene, beispielsweise in ein Nukleinsäurefragment bzw. in einen Vektor eingebaut werden, der vorzugsweise die den jeweiligen Genen zugeordnete, regulatorische Gensequenzen oder

analog wirkende Promotoraktivität enthält. Insbesondere werden solche regulatorische Sequenzen verwendet, die die Genexpression verstärken.

- 5 Vorteilhafterweise enthält das Nukleinsäurefragment zur Expression der weiteren enthaltenen Gene zusätzlich noch 3' und/oder 5' Terminale regulatorische Sequenzen zur Steigerung der Expression, die je nach ausgewähltem Wirtsorganismus und Gen oder Gene für eine optimale Expression ausgewählt werden.

10

Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder daß

- 15 es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der

- 20 regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

25

In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann das erfindungsgemäße Genkonstrukt auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Organismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus

- 30 integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Plasmid oder nur aus dem Nukleinsäurefragment als Vektor oder der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz bestehen.

Vorteilhafterweise wird die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz

- 35 zusammen mit mindestens einem Reportergen in ein Nukleinsäurekonstrukt kloniert, das in das Genom eingebracht wird. Dieses Reportergen sollte eine leichte Detektierbarkeit über einen Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemo-, Biolumineszenz- oder Resistenzassay oder über eine photometrische Messung ermöglichen. Beispiels-
- 40 spielhaft seien als Reportergene Antibiotika- oder Herbizidresistenzgene, Hydrolasegene, Fluoreszenzproteingene, Biolumineszenzgene, Zucker- oder Nukleotidstoffwechselgene oder Biosynthesegene wie das Ura3-Gen, das Ilv2-Gen, das Luciferasegen, das  $\beta$ -Galactosidasegen, das gfp-Gen, das 2-Desoxyglucose-6-
- 45 phosphat-Phosphatasegen, das  $\beta$ -Glucuronidase-Gen,  $\beta$ -Lactamasegen, das Neomycinphosphotransferasegen, das Hygromycinphosphotransferasegen oder das BASTA (= Gluphosinat) Resistenz-Gen

## 10

genannt. Diese Gene ermöglichen eine leichte Messbarkeit und Quantifizierbarkeit der Transkriptionsaktivität und damit der Expression der Gene. Damit lassen sich Genomstellen identifizieren, die eine unterschiedliche Produktivität zeigen.

5

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform kann die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz auch alleine in einen Organismus eingebracht werden.

- 10 Sollen neben der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz weitere Gene in den Organismus eingeführt werden, so können alle zusammen mit einem Reportergen in einem einzigen Vektor oder jedes einzelne Gen mit einem Reportergen in je einem Vektor in den Organismus eingebracht werden, wobei die verschiedenen Vektoren
- 15 gleichzeitig oder sukzessive eingebracht werden können.

Der Wirtsorganismus enthält vorteilhaft mindestens eine Kopie der erfindungsgemäßen Nukleinsäure und/oder des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukts.

20

Das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, des Nukleinsäurekonstrukts oder des Vektors in Organismen beispielsweise Pflanzen kann prinzipiell nach allen dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.

25

Für Mikroorganismen kann der Fachmann entsprechende Methoden den Lehrbüchern von Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, von F.M. Ausubel et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons, von D.M. Glover et al., DNA Cloning Vol.1, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), von Kaiser et al. (1994) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Guthrie et al. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, 1994, Academic Press entnehmen.

35

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen

- 40 Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, die Verwendung einer Genkanone, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer.

- 45 Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und

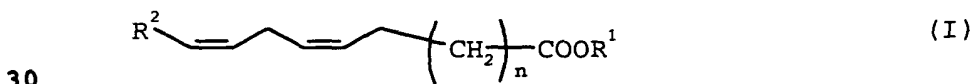
## 11

- R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205-225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711). Die Transformation von Pflanzen mit *Agrobacterium tumefaciens* wird beispielsweise von Höfgen und Willmitzer in Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877 beschrieben.
- 10 Mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformierte *Agrobakterien* können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen wie Testpflanzen wie *Arabidopsis* oder Kulturpflanzen, insbesondere von Öl-haltigen Kulturpflanzen, wie Soja, Erdnuß, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs,
- 15 Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer *Agrobakterienlösung* gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.
- 20 Die genetisch veränderten Pflanzenzellen können über alle dem Fachmann bekannten Methoden regeneriert werden. Entsprechende Methoden können den oben genannten Schriften von S.D. Kung und R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.
- 25 Als Organismen bzw. Wirtsorganismen für die erfindungsgemäße Nukleinsäure, das Nukleinsäurekonstrukt oder den Vektor eignen sich prinzipiell alle Organismen, die in der Lage sind Fettsäuren speziell ungesättigte Fettsäuren zu synthetisieren bzw. für die Expression rekombinanter Gene geeignet sind. Beispielhaft seien
- 30 Pflanzen wie *Arabidopsis*, *Asteraceae* wie *Calendula* oder Kulturpflanzen wie Soja, Erdnuß, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Pilze beispielsweise die Gattung *Mortierella*, *Saprolegnia* oder *Pythium*, Bakterien wie
- 35 die Gattung *Escherichia*, Hefen wie die Gattung *Saccharomyces*, Algen oder Protozoen wie *Dinoflagellaten* wie *Cryptothecodinium* genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Pilze wie *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum* oder Pflanzen wie Soja, Raps, Flachs,
- 40 Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor, Rizinus, *Calendula*, Erdnuß, Kakaobohne oder Sonnenblume oder Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, besonders bevorzugt werden Soja, Raps, Flachs, Sonnenblume, *Calendula* oder *Saccharomyces cerevisiae*. Prinzipiell sind als Wirtsorganismen auch transgene Tiere beispielsweise *Caenorhabditis elegans*.
- 45

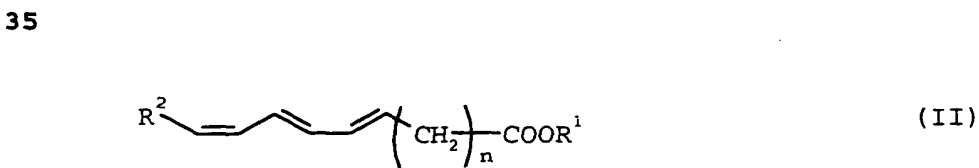


## 12

- Eine weitere erfindungsgemäße Ausgestaltung sind wie oben beschrieben transgene Pflanzen, die eine funktionelle oder nicht funktionelle Nukleinsäure oder ein funktionelles oder nicht funktionelles Nukleinsäurekonstrukt enthalten. Unter nicht funktionell ist zu verstehen, daß kein enzymatisch aktives Protein mehr synthetisiert wird, da das natürliche Gen inaktiviert wurde. Außerdem ist unter nicht funktionellen Nukleinsäuren oder Nukleinsäurekonstrukten auch eine sogenannte Antisense-DNA zu verstehen, die zu transgenen Pflanzen führt, die eine Reduktion der enzymatischen Aktivität oder keine enzymatischen Aktivität aufweisen. Mit Hilfe der Antisense-Technik, speziell wenn die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz mit anderen Fettsäuresynthesegenen in der Antisense-DNA kombiniert wird, ist es möglich Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten Fettsäuren bzw. gesättigte Fettsäuren zu synthetisieren. Unter transgenen Pflanzen sind einzelne Pflanzenzellen und deren Kulturen auf Festmedien oder in Flüssigkultur, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu verstehen.
- 20 Die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstruktes zur Herstellung von transgenen Pflanzen gehört deshalb auch zu den Erfindungsgegenständen.
- 25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Enzym, das eine Fettsäure der allgemeinen Struktur I,



- die zwei durch eine Methylengruppe voneinander getrennte Doppelbindungen aufweist, zu einer dreifach ungesättigten Fettsäure der allgemeinen Struktur II

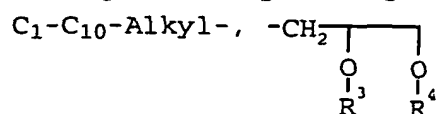


- 40 umsetzt, wobei die drei Doppelbindungen der Fettsäure in Konjugation sind und wobei die Substituenten und Variablen in den Verbindungen der allgemeinen Struktur I und II folgende Bedeutung haben:

45

## 13

$R^1$  = Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, ungesättigtes oder gesättigtes, verzweigtes oder unverzweigtes



5

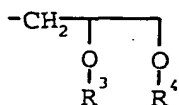
$R^2$  = substituiertes oder unsubstituiertes, ungesättigtes oder gesättigtes  $C_1$ - $C_9$ -Alkyl-

10  $R^3$  und  $R^4$  unabhängig voneinander Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, gesättigtes oder ungesättigtes, verzweigtes oder unverzweigtes  $C_1$ - $C_{22}$ -Alkylcarbonyl- oder Phospho-,

15  $n$  = 1 bis 14, bevorzugt 1 bis 8, besonders bevorzugt 4 bis 6, ganz besonders bevorzugt 6.

$R^1$  bezeichnet in den Verbindungen der Formeln I und II Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, ungesättigtes oder gesättigtes, verzweigtes oder unverzweigtes  $C_1$ - $C_{10}$ -Alkyl-, oder

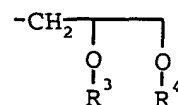
20



25 Als Alkylreste seien substituierte oder unsubstituierte verzweigte oder unverzweigte  $C_1$ - $C_{10}$ -Alkylketten wie beispielsweise Methyl, Ethyl, n-Propyl, 1-Methylethyl, n-Butyl, 1-Methylpropyl-, 2-Methylpropyl, 1,1-Dimethylethyl, n-Pentyl, 1-Methylbutyl, 2-Methylbutyl, 3-Methylbutyl, 2,2-Dimethylpropyl, 1-Ethylpropyl, 30 n-Hexyl, 1,1-Dimethylpropyl, 1,2-Dimethylpropyl, 1-Methylpentyl, 2-Methylpentyl, 3-Methylpentyl, 4-Methylpentyl, 1,1-Dimethylbutyl, 1,2-Dimethylbutyl, 1,3-Dimethylbutyl, 2,2-Dimethylbutyl, 2,3-Dimethylbutyl, 3,3-Dimethylbutyl, 1-Ethylbutyl, 2-Ethylbutyl, 1,1,2-Trimethylpropyl, 1,2,2-Trimethylpropyl, 1-Ethyl-1-methyl- 35 propyl, 1-Ethyl-2-methylpropyl, n-Heptyl, n-Octyl, n-Nonyl oder n-Decyl genannt.

Bevorzugte Reste für  $R^1$  sind Wasserstoff und

40



45  $R^2$  bezeichnet in den Verbindungen der Formeln I und II substituiertes oder unsubstituiertes, ungesättigtes oder gesättigtes  $C_1$ - $C_9$ -Alkyl-.

## 14

Als Alkylreste seien substituierte oder unsubstituierte verzweigte oder unverzweigte C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>-Alkylketten wie beispielsweise Methyl, Ethyl, n-Propyl, 1-Methylethyl, n-Butyl, 1-Methylpropyl-, 2-Methylpropyl, 1,1-Dimethylethyl, n-Pentyl, 1-Methylbutyl, 5 2-Methylbutyl, 3-Methylbutyl, 2,2-Dimethylpropyl, 1-Ethylpropyl, n-Hexyl, 1,1-Dimethylpropyl, 1,2-Dimethylpropyl, 1-Methylpentyl, 2-Methylpentyl, 3-Methylpentyl, 4-Methylpentyl, 1,1-Dimethylbutyl, 1,2-Dimethylbutyl, 1,3-Dimethylbutyl, 2,2-Dimethylbutyl, 2,3-Dimethylbutyl, 3,3-Dimethylbutyl, 1-Ethylbutyl, 2-Ethylbutyl, 10 1,1,2-Trimethylpropyl, 1,2,2-Trimethylpropyl, 1-Ethyl-1-methylpropyl, 1-Ethyl-2-methylpropyl, n-Heptyl, n-Octyl oder n-Nonyl genannt. Bevorzugt ist C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>-Alkyl, besonders bevorzugt ist C<sub>5</sub>-Alkyl.

15 R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> bezeichnen unabhängig voneinander Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, gesättigtes oder ungesättigtes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonyl- oder Phospho-.

20 C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonyl wie Methylcarbonyl, Ethylcarbonyl, n Propylcarbonyl, 1 Methylethyl carbonyl, n Butylcarbonyl, 1 Methylpropylcarbonyl, 2 Methylpropylcarbonyl, 1,1 Dimethylethylcarbonyl, n Pentylcarbonyl, 1 Methylbutylcarbonyl, 2 Methylbutylcarbonyl,

25 3 Methylbutylcarbonyl, 1,1 Dimethylpropylcarbonyl, 1,2 Dimethylpropylcarbonyl, 2,2 Dimethylpropylcarbonyl, 1 Ethylpropylcarbonyl, n Hexylcarbonyl, 1 Methylpentylcarbonyl, 2 Methylpentylcarbonyl, 3 Methylpentylcarbonyl, 4 Methylpentylcarbonyl, 1,1 Dimethylbutylcarbonyl,

30 1,2 Dimethylbutylcarbonyl, 1,3 Dimethylbutylcarbonyl, 2,2 Dimethylbutylcarbonyl, 2,3 Dimethylbutylcarbonyl, 3,3 Dimethylbutylcarbonyl, 1 Ethylbutylcarbonyl, 2 Ethylbutylcarbonyl, 1,1,2 Trimethylpropylcarbonyl,

1,2,2 Trimethylpropylcarbonyl, 1 Ethyl 1 methylpropylcarbonyl und 35 1 Ethyl 2 methylpropylcarbonyl, Heptylcarbonyl, Nonylcarbonyl, Decylcarbonyl, Undecylcarbonyl, n-Dodecylcarbonyl, n-Tridecylcarbonyl, n-Tetradecylcarbonyl, n-Pentadecylcarbonyl, n-Hexadecylcarbonyl, n-Heptadecylcarbonyl, n-Octadecylcarbonyl, n-Nonadecylcarbonyl oder n-Eicosylcarbonyl.

40

Bevorzugte Substituenten für R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> sind gesättigtes oder ungesättigtes C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonyl.

Als Substituenten der genannten Reste seien beispielsweise

45 Halogen wie Fluor oder Chlor, Alkyl oder Hydroxyl genannt.

## 15

Bei der Umsetzung mit dem erfindungsgemäßen Enzym wird eine Doppelbindung in die Fettsäure eingeführt und eine Doppelbindung verschoben, so daß die an der Reaktion beteiligten drei Doppelbindungen in Konjugation liegen. Weiterhin wird eine Doppelbindung isomerisiert (von cis zu trans).

Das Enzym (= Calendulasäure-Desaturase) katalysiert vorteilhaft die Umsetzung von Linolsäure (18:2, 9Z,12Z) zu Calendulasäure (18:3, 8E,10E,12Z). Das Enzym führt eine trans-Doppelbindung an Position C8 ein und bewirkt die spezifische Verschiebung einer cis-Doppelbindung in Position C9 zu einer trans-Doppelbindung in Position C10, wobei die Isomerisierung regiospezifisch erfolgt. Ein möglicher hypothetischer Reaktionsmechanismus ist in Fig. 1 dargestellt. Nach einer Deprotonierung an C8 der Linolsäure und einer Umlagerung des Radikals nach C10 kommt es im Zuge einer Wasserabspaltung zur Deprotonierung an C11 und damit zur Bildung von Calendulasäure. Gleichzeitig wird gebundenes Fe IV zu Fe III reduziert. Fig. 1 gibt den hypothetischen Mechanismus für (8,11)-Linoleoyl Desaturase (Calendulasäure-Desaturase) modifiziert nach Svatos, A et al. (Insect Biochemistry and Molecular Biology 29,1999:225-232) basierend auf dem vorgeschlagenen Katalysemechanismus für  $\Delta 9$  Desaturase aus Ricinus (Lindqvist, Y et al., EMBO Journal 15, 1996:4081-4092) wieder. Als Substrate kommen weiterhin auch die 6Z,9Z,12Z, 18:3-Fettsäure und die 9Z,12Z,15Z, 18:3-Fettsäure in Frage, die dann zu 6Z,8E,10E,12Z- bzw. 8E,10E,12Z,15Z-Fettsäuren umgesetzt werden.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine oben beschriebene erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt in einen bevorzugt Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert und die im Öl enthaltenden Fettsäuren freisetzt.

Auch ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine oben beschriebene erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert, gehört zu den Erfindungsgegenständen.

## 16

Beide Verfahren ermöglichen vorteilhaft die Synthese von Fettsäuren oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren wie Calendulasäure.

- 5 Weitere erfindungsgemäße Gegenstände sind ein Verfahren zur Herstellung von gesättigten Fettsäuren dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine nicht funktionelle oben genannte erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder mindestens ein nicht funktionelles erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht, das in dem Organismus enthaltene Öl isoliert und die im Öl enthaltenen Fettsäuren freisetzt und ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten Fettsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man mindestens eine nicht funktionelle oben genannte erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder mindestens ein nicht funktionelles erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und daß in dem Organismus enthaltene Öl isoliert. Für diese beiden Verfahren wird die sogenannte Antisense-Technologie verwendet (siehe oben) bzw. die natürlichen Synthesegene inaktiviert.

- Als Organismen für die genannten Verfahren seien beispielhaft Pflanzen wie Arabidopsis, Soja, Erdnuß, Rizinus, Sonnenblume, 25 Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Pilze *Mortierella*, *Saprolegnia* oder *Pythium*, Bakterien wie die Gattung *Escherichia*, Hefen wie die Gattung *Saccharomyces*, Algen oder Protozoen wie Dinoflagellaten wie *Cryptocodinium* genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Pilze wie *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum* oder Pflanzen wie Soja, Raps, Flachs, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor, Rizinus, Calendula, Erdnuß, Kakaobohne oder Sonnenblume oder Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, 30 besonders bevorzugt werden Soja, Raps, Flachs, Sonnenblume, Calendula oder *Saccharomyces cerevisiae*. 35

- Die in den Verfahren verwendeten Organismen werden je nach Wirtsorganismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. ge- 40 züchtet. Mikroorganismen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, eine Phosphatquelle wie Kaliumhydrogenphosphat, Spurenelemente wie Eisen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0 °C und 100 °C, bevorzugt zwischen 10 °C bis 60 °C unter Sauerstoffbegasung angezogen. Dabei 45

## 17

kann der pH der Nährflüssigkeit auf einen festen Wert gehalten werden, das heißt während der Anzucht wird der pH reguliert. Es ist auch eine Anzucht ohne pH-Regulation möglich. Die Anzucht kann im batch, semi batch oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuierlich nach gefüttert werden.

Pflanzen werden nach Transformation zunächst wie oben beschrieben regeneriert und anschließend wie üblich angezüchtet bzw. angebaut.

Aus den Organismen werden nach Anzucht die Lipide in üblicher Weise gewonnen. Hierzu können die Organismen nach Ernte zunächst aufgeschlossen werden oder direkt verwendet werden. Die Lipide werden vorteilhaft mit geeigneten Lösungsmitteln wie apolare Lösungsmittel wie Hexan oder polaren wie Ethanol, Isopropanol oder Gemischen wie Hexan/Isopropanol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol bei Temperaturen zwischen 0 °C bis 80 °C, bevorzugt zwischen 20 °C bis 50 °C extrahiert. Die Biomasse wird in der Regel mit einem Überschuß an Lösungsmittel extrahiert beispielsweise einem Überschuß von Lösungsmittel zu Biomasse von 1:4. Das Lösungsmittel wird anschließend beispielsweise über eine Destillation entfernt. Die Extraktion kann auch mit superkritischem CO<sub>2</sub> erfolgen. Nach Extraktion kann die restliche Biomasse beispielsweise über Filtration entfernt werden. Standardmethoden zur Extraktion von Fettsäuren aus Pflanzen und Mikroorganismen werden in Bligh et al. (Can. J. Biochem. Physiol. 37, 1959: 911-917) oder Vick et al. (Plant Physiol. 69, 1982: 1103-1108) beschrieben.

Das so gewonnene Rohöl kann anschließend weiter aufgereinigt werden, beispielsweise in dem Trübungen über das Versetzen mit polaren Lösungsmitteln wie Aceton oder apolaren Lösungsmitteln wie Chloroform und anschließender Filtration oder Zentrifugation entfernt werden. Auch eine weitere Reinigung über Säulen oder anderen Techniken ist möglich.

Zur Gewinnung der freien Fettsäuren aus den Triglyceriden werden diese in üblicherweise verseift beispielsweise mit NaOH oder KOH.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind ungesättigte oder gesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren, die nach den oben genannten Verfahren hergestellt wurden sowie deren Verwendung zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Tierfutter, Kosmetika oder Pharmazeutika. Hierzu werden diese den Nahrungs-

## 18

mitteln, dem Tierfutter, den Kosmetika oder Pharmazeutika in üblichen Mengen zugesetzt.

Die Erfindung wird in den folgenden Beispielen näher erläutert:

5

## Beispiele

- Über RT-PCR und RACE-Techniken wurde aus mRNA von *Calendula officinalis* eine cDNA kloniert. Bei Expression dieser cDNA in
- 10 Hefe wird Linolsäure in das Octadecakonjugat Calendulasäure (8E, 10E, 12Z) umgesetzt. Es handelt sich hierbei unseres Wissens nach um die erstmalige Beschreibung einer Calendulasäure-Desaturase. Das Enzym bewirkt eine regiospezifische Verschiebung einer *cis*-Doppelbindung in Position C9 zu einer *trans*-Doppel-
- 15 bindung in Position C10 und führt eine neue *trans*-Doppelbindung an Position C8 ein.

- Transgene Hefen und Pflanzen mit erhöhter Expression der Calendulasäure-Desaturase-cDNA weisen Calendulasäure in ihren
- 20 Lipiden auf.

Beispiel 1: RNA-Isolierung aus Samen von *Calendula officinalis*

- Um cDNA-Klone für Calendulasäure-Desaturase per PCR isolieren zu
- 25 können, wurde RNA aus Samen von *Calendula officinalis* präpariert. Aufgrund des hohen Fettgehalts der Samen konnten hierzu keine Standardprotokolle verwendet werden, sondern es wurde die folgende Methode angewandt:

- 30 20 g Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff zu einem Pulver zermörsert. 100 ml Extraktionspuffer I [100 mM Tris/HCl, pH 7,5, 25 mM EDTA, 2 % (w/v) Laurylsarkosyl, 4 M Guanidiniumthiocyanat, 5 % (w/v) PVP (= Polyvinylpyrrolidon), 1 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol] wurden zugegeben, sofort durchmischt und homo-
- 35 genisiert. Die Lösung wurde in 50 ml-Gefäße überführt und für ca. 15 min geschüttelt. Nach einer Zentrifugation bei 4000 g für 10-15 min wurde die oben schwimmende Fettschicht bzw. Fetttropfen abgenommen und der Überstand in frische Gefäße überführt. Es folgte eine Extraktion mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylal-
- 40 kohol (= PCI, 25:24:1) und eine Extraktion mit Chloroform, wobei jeweils 15 Minuten lang geschüttelt und dann abzentrifugiert wurde. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen, auf ein 8 ml CsCl-Kissen (5 M CsCl) geschichtet und 18 Stunden lang bei 18 °C und 100 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und
- 45 das RNA-Präzipitat kurz getrocknet. Nach einem Waschschriff mit 70 % Ethanol wurde die RNA in einer Mischung aus 7,5 ml Extraktionspuffer II (100 mM Tris/HCl, pH 8,8, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA,

## 19

2 % SDS) und 10 ml PCI gelöst, 15 Minuten lang geschüttelt und abzentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde nach einer Chloroform-Extraktion mit dem gleichen Volumen 5 M LiCl versetzt. Die RNA-Fällung erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde  
5 60 Minuten lang bei 12000 g und 4 °C abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde zwei mal mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet und schließlich in 500 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Aus der so gewonnenen Calendula-Gesamt-RNA wurde mit dem Poly-At-  
10 tract-Kit (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mRNA isoliert. 1 µg dieser mRNA wurden mit der SuperscriptII reversen Transkriptase von Gibco BRL (Eggenstein) mit 200 pmol oligo-dT-Primer nach Herstellervorschrift in cDNA übersetzt und als Template in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt.

15

Beispiel 2 : Isolierung und Klonierung der Calendulasäure-  
Desaturase aus Calendula officinalis

Um DNA-Sequenzen aus Calendula officinalis zu isolieren, die für  
20 eine Calendulasäure-Desaturase kodieren, wurden verschiedene degenerierte Oligonukleotidprimer von Aminosäure-Sequenzen der konservierten Histidin-Boxen verschiedener Δ12-Desaturasen abgeleitet.

25 Primer A: 5' - CCD TAY TTC TCI TGG AAR WWH AGY CAY CG - 3'  
Forward primer, abgeleitet von der Aminosäuresequenz  
P Y F S W K Y/I S H R

Primer B: 5' - CCA RTY CCA YTC IGW BGA RTC RTA RTG - 3'  
30 Reverse primer, abgeleitet von der Aminosäuresequenz  
H Y D S S/T E W D/N W

Die Buchstaben in Primer A und B haben folgende Bedeutung:

35 R = A/G  
Y = C/T  
W = A/T  
H = A/C/T  
B = C/G/T  
40 D = A/G/T  
I = Inositol

In einer PCR mit Calendula-Einzelstrang-cDNA (hergestellt nach Beispiel 1) als Template wurde mit den Primern A und B ein  
45 DNA-Fragment mit einer Länge von 470 bp amplifiziert. Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:



## 20

1. 2 min 94 °C
2. 30 sec 94 °C
3. 45 sec 50 °C (Bindungstemperatur)
4. 1 min 72 °C
- 5 10 x 2. bis 4.
5. 0 sec 94 °C
6. 45 sec 50 °C
7. 1 min 72 °C, Zeitincrement 5 sec pro Zyklus
- 20 x 5. Bis 7.
- 10 8. 2 min 72 °C

Für die Amplifikation wurde die Tfi-DNA-Polymerase von Biozym (Hess. Oldendorf) verwendet. Das 470 bp lange DNA-Fragment wurde mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen, Carlsbad, USA) in  
15 den Vektor pCR 2.1-TOPO kloniert und sequenziert. Die Sequenz des 470 bp-Fragments entsprach der Sequenz von Nukleotid 466 bis 893 von SEQ ID NO:1.

Beispiel 3: Gewinnung und Sequenzierung vollständiger cDNA-Klone  
20

Um einen Vollängen-Klon zu erhalten, wurde das Fragment mittels 5'- und 3'- RACE (rapid amplification of cDNA ends) verlängert. Ausgehend von 1 µg mRNA (isoliert nach Beispiel 1) wurde mit dem "Marathon cDNA Amplification Kit" von CLONTECH (Heidelberg)  
25 doppelsträngige cDNA hergestellt. Nach erfolgreicher Adaptorligation wurde mit folgenden Primern 5'- bzw. 3'-RACE durchgeführt:

Spezifische Primer für 5'-RACE:

- 30 Primer C 5' - GTG AGG GAG TGA GAG ATG GGT GTG GTG C - 3'  
Primer D 5' - AAC ACA CTT ACA CCT AGT ACT GGA ATT G - 3'

Spezifische Primer für 3'-RACE:

- 35 Primer E 5' - TAT TCC AAA CTT CTT AAC AAT CCA CCC G - 3'  
Primer F 5' - CAA TTC CAG TAC TAG GTG TAA GTG TGT T - 3'

Zunächst wurde eine PCR mit der adaptorligierten doppelsträngigen -cDNA und Primer C bzw. E durchgeführt, danach erfolgte eine  
40 zweite PCR mit Primer D bzw. F und einer 1:50-Verdünnung des PCR-Produkts aus der Reaktion mit Primer C bzw. E als Template.

## 21

Die RACE-PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1. 1 min 94 °C
2. 30 sec 94 °C
- 5 3. 3 min 68 °C
- 10 x 2. - 3.
4. 30 sec 94 °C
5. 30 sec 65 °C
6. 3 min 68 °C
- 10 25 x 4. - 6.
7. 5 min 68 °C

Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des TOPO TA Cloning-Kits (Invitrogen, Carlsbad, USA) in pCR 2.1-TOPO kloniert und sequenziert. Das 5'-RACE-Produkt reichte über das Startkodon in den 5'-nicht-translatierten-Bereich (5'-UTR), das 3'-RACE über das Stopkodon in den 3'- UTR hinein.

Die zusammengesetzte Sequenz bestehend aus dem ersten PCR-Produkt und den RACE-Produkten ist in SEQ ID NO: 1 dargestellt. Der kodierende Bereich erstreckt sich von Nukleotid 42 (Startkodon) bis 1175 (Stopkodon). Die 5'- und 3'-UTRs wurden nur einzelsträngig sequenziert, so daß hier einzelne Sequenzierfehler möglich sind.

Um einen durchgängigen Vollängen-Klon zu erhalten, wurde mit dem Expand High Fidelity-System (Boehringer, Mannheim) und den Primern G und H sowie mit Calendula-cDNA (siehe Beispiel 1) als Template eine PCR durchgeführt.

30 Primer G 5' - ATTAGAGCTCATGGGTGCTGGTGGTCGGATGTCTG - 3'  
Forward Primer (mit SacI-Schnittstelle)

Primer H 5' - ATTACTCGAGTGACATACACCTTTTGTATTACATCTTG - 3'  
Reverse Primer (mit XhoI-Schnittstelle)

35

Die PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1. 2 min 94 °C
2. 30 sec 94 °C
- 40 3. 35 sec 63 °C
4. 2 min 72 °C
- 10 x 2. - 4.
5. 30 sec 94 °C
6. 35 sec 63 °C
- 45 7. 2 min 72 °C, Zeitincrement 5 sec pro Zyklus
- 15 x 5. - 7
8. 2 min 72 °C.

## 22

Das PCR-Produkt mit einer Länge von 1,2 kb wurde in den Vektor pGEM-T (Promega, Mannheim) kloniert und in *E. coli* DH10B transformiert. Die Insert-DNA wurde mit einem 373 DNA-Sequencer (Applied Biosystems) doppelsträngig sequenziert. Dazu wurden  
5 neben Reverse Primer und -21 Primer folgende sequenzspezifische Primer benutzt:

Primer I: 5' - CGG TCT TCT CGC TGT ATT - 3'

10 Primer J: 5' - ATT ACC CAA GCT GCC C - 3'

Die vollständige DNA-Sequenz der Calendulasäure-Desaturase (CalDes) ist identisch mit dem Abschnitt von Nukleotid 42 bis 1193 von SEQ ID NO:1. Die Sequenz umfaßt den kodierenden Bereich  
15 und einen kurzen Abschnitt des 3'-UTR.

Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von Co-CalDes (SEQ ID NO:2) mit annotierten Proteinsequenzen der SWISS-PROT und SP-TREMBL-Datenbanken ergab die höchste Homologie zu einer  
20  $\Delta 12$ -Acetylenase aus *Crepis alpina* (SP\_PL: 081931, 74 % identische Aminosäuren), einer  $\Delta 12$ -Epoxygenase aus *Crepis palaestina* (SP\_PL: 065771, 73 % identische Aminosäuren) und einer  $\Delta 12$ -Desaturase aus *Borago officinalis* (SP\_PL: 082729, 62 % identische Aminosäuren) über den gesamten kodierenden Bereich. Die Sequenzvergleiche sind  
25 in Fig.2 dargestellt. Fig. 2 zeigt einen Vergleich der Aminosäure-Sequenzen von Co-CalDes mit  $\Delta 12$ -Acetylenase aus *Crepis alpina* (Ca-Acetyl),  $\Delta 12$ -Epoxygenase aus *Crepis palaestina* (Cp-Epoxy) und  $\Delta 12$ -Desaturase aus *Borago officinalis* (Bo-Des).

30 Beispiel 4: Expression der Calendulasäure-Desaturase in Hefe

Um die Funktionalität von CalDes nachzuweisen, wurde in einem ersten Ansatz der kodierende Bereich der cDNA in einem Hefe-Expressionsvektor kloniert und in *S. cerevisiae* exprimiert. Die  
35 in der Hefe produzierte Calendulasäure-Desaturase sollte zugesetzte Linolsäure in Calendulasäure umsetzen. Diese wiederum sollte in hydrolisierten Lipidextrakten über HPLC nachgewiesen werden.

40 In einem zweiten Ansatz wurde zusätzlich zu CalDes die  $\Delta 12$ -Desaturase FAD2 aus *A. thaliana* (Kajiwara et al., Appl. Environ. Microbiol., 62, 1996: 4309 - 4313) in Hefe exprimiert, so daß die Hefezellen endogen Linolsäure produzieren, die dann wiederum durch die Aktivität von CalDes in Calendulasäure  
45 umgesetzt werden kann. Letztere sollte wiederum über HPLC nachgewiesen werden.

Sämtliche Fest- und Flüssigmedien für Hefe wurden nach Protokollen von Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1995) hergestellt.

- 5 Die CalDes-cDNA wurde über Restriktionsverdau mit SacI/XhoI aus dem Vektor pGEM-T ausgeschnitten, in den SacI/XhoI geschnittenen shuttle-Vektor pYES2 (Invitrogen, Carlsbad, USA) kloniert und der so entstandene Vektor pYES2-CalDes in E. coli XL1 blue transformiert. Nach erneuter Plasmidpräparation mit Hilfe des Plasmid
- 10 Maxi Kits (QIAGEN) wurde pYES2-CalDes mit Hilfe der Polyethylenglycol-Methode (Von Pein M., Dissertation, Heinrich Heine-Universität Düsseldorf, 1992) in S. cerevisiae INCSv1 (Invitrogen, Carlsbad, USA) transformiert, wo die Expression der CalDes-cDNA unter der Kontrolle des GAL1-Promotors stand.
- 15 Um im zweiten Ansatz zusätzlich zu CalDes auch FAD2 in Hefe exprimieren zu können, wurde zunächst der kodierende Bereich des FAD2-Gens über PCR (Protokoll siehe Primer G und H) aus A. thaliana-cDNA mit Hilfe der Tfl-Polymerase (Biozym) amplifiziert.
- 20 Folgende Primer wurden hierfür verwendet:

Primer K: 5' - AAACTCGAGATGGGTGCAGGTGGAAGAATGCCGG - 3'  
Forward Primer (XhoI-Schnittstelle)

- 25 Primer L: 5' - AAAAAGCTTTCATAACTTATTGTTGTACCAGTACACACC - 3'  
Reverse Primer (HindIII-Schnittstelle)

- Das entstandene PCR-Produkt wurde nach Restriktionsverdau mit XhoI/HindIII in den XhoI/HindIII geschnittenen Hefe-Expressions-
- 30 vektor pESC-Leu (Stratagene) kloniert, wo die FAD2-DNA unter Kontrolle des GAL1-Promotors stand.

- Die Expression von CalDes in S. cerevisiae INCSv1 erfolgte modifiziert nach Avery et al. (Appl. Environ. Microbiol., 62, 1996: 3960 - 3966) und Girke et al. (The Plant Journal, 5, 1998: 39 - 48). Um eine Starterkultur herzustellen, wurden 10 ml YPAD-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und 48 Stunden lang bei 30 °C bei 200 rpm inkubiert. Die Zellkultur wurde dann in 1 x YPA-Medium ohne Zucker gewaschen und abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 2 ml Minimalmedium ohne Supplemente und ohne Zucker resuspendiert. Mit 1 ml dieser Zellsuspension wurden 100 ml Minimalmedium (dropout powder, 2 % Raffinose, 1 % Tergitol NP40) in 500 ml Erlenmeyerkolben angeimpft und die Kultur bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurden 2 % (w/v)
- 45 Galaktose zugegeben und (für den ersten Ansatz) 0,003 % Linolsäure (3%ige Stammlösung in 5 % Tergitol NP40). Die Zellen wurden weiter kultiviert bis zum Erreichen der stationären Phase. Dann

wurden sie in Minimalmedium ohne Supplemente gewaschen und bei -20 °C aufbewahrt.

Beispiel 5: Lipidextraktion und HPLC-Analyse der Fettsäuren aus transgener Hefe

Die Hefezellen wurden in 30 ml HIP-Lösung (0,1 mM 2,6-Di-tert.-butyl-4-methyl-phenol in Hexan : Isopropanol (3:2 v/v)) suspendiert, mit 150 µl konzentrierter HCl angesäuert und mit Ultra-  
10 Turrax homogenisiert (1 min, 24000 rpm). Anschließend wurden die Proben 10 min lang bei 4 °C geschüttelt und bei 5000 g und 4 °C 10 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 0,38 M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf 47,5 ml aufgefüllt. Die Proben wurden wiederum 10 min lang bei 4 °C geschüttelt und abzen-  
15 trifugiert (s.o.). Die Hexanphase wurde abgenommen und unter N<sub>2</sub>-Strom eingedampft. Der Rückstand wurde in 20 µl Chloroform gelöst. Zur alkalischen Hydrolyse von Fettsäure-Estern wurden 400 µl Methanol sowie 80 µl 40 %ige (w/v) KOH-Lösung zugegeben und die Probe 20 min lang bei 60 °C unter Argon inkubiert. Anschlie-  
20 ßend wurde die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 35 µl konzentrierter HCl auf pH 3,0 angesäuert und per HPLC aufgetrennt.

Die Trennung der freien Fettsäuren erfolgte mit einer ET 250/4 Nucleosil 120-5 C18-Säule (Macherey & Nagel). Als Laufmittel  
25 diente Methanol: H<sub>2</sub>O: Eisessig (85:15:0,1 v/v/v). Die Trennung erfolgte bei einer Flußrate von 1 ml/min und 25 °C, zur Detektion der Konjutriene wurde die Absorption bei 268 nm gemessen.

Fig. 3 zeigt die Elutionsprofile der Lipidextrakte nach alkali-  
30 scher Hydrolyse aus transformierten Hefezellen (Fig. 3B, Elutionsprofil von *S. cerevisiae* INCSv1 transformiert mit FAD2-DNA aus *A. thaliana* und C, Elutionsprofil von *S. cerevisiae* INCSv1 transformiert mit pYES2-CalDes aus *Calendula officinalis*) bzw. das Elutionsprofil eines Calendulasäure-Standards (Fig. 3A).  
35 Calendulasäure hat eine Retentionszeit von 12 min mit einer für Konjutriene typischen, starken Absorption bei 268 nm. Die hydrolysierten Lipidextrakte von Hefezellen, die mit dem leeren Vektor pYES2 transformiert und mit 0,003 % Linolsäure angezogen wurden, weisen keine Fettsäuren mit einer Retentionszeit von Calendula-  
40 säure auf (nicht gezeigt). Ebenso enthalten die hydrolysierten Lipidextrakte von Hefezellen, die das FAD2-Gen exprimieren keine Calendulasäure (Fig. 3B).

Die HPLC-Analyse der Extrakte von mit pYES2-CalDes transformier-  
45 ten Hefezellen, die mit 0,003 % Linolsäure angezogen wurden, hingegen zeigten ein Signal mit der Retentionszeit von Calendulasäure (Fig. 3C), das auch das gleiche Absorptionsspektrum mit ei-

nem Maximum bei 268 nm und Nebenmaxima bei 258 und 282 nm aufwies wie der Standard (Fig. 4A, Standard und C, Elutionsprofil von *S. cerevisiae* INCSv1 transformiert mit pYES2-CalDes aus *Calendula officinalis*). Damit war gezeigt, daß die Expression von Calendulasäure-Desaturase in Hefe zur Biosynthese von Calendulasäure führt. Der Nachweis von Calendulasäure aus transformierten Hefezellen gelang nur nach Hydrolyse der Lipide. In den freien Fettsäuren dieser Zellen konnte keine Calendulasäure nachgewiesen werden, das heißt Calendulasäure wird in Hefe in Lipide eingebaut. Da Hefe keine Triacylglyceride enthält, muß man davon ausgehen, daß die nachgewiesene Calendulasäure in den Phospholipiden der Hefe gebunden war.

Darüberhinaus enthalten die Lipidextrakte von transgenen Hefezellen, die gleichzeitig FAD2 und CalDes exprimieren ebenfalls Calendulasäure (nicht gezeigt).

Beispiel 6: Expression der Calendulasäure-Desaturase in *Arabidopsis thaliana* und *Linum usitatissimum*

- Die Expression der Calendulasäure-Desaturase aus *Calendula officinalis* in transgenen Pflanzen ist vorteilhaft, um den Calendulasäure-Gehalt in diesen Pflanzen zu erhöhen. Dazu wurde die CalDes cDNA in binäre Vektoren kloniert und über Agrobacterium-vermittelten DNA-Transfer in *A. thaliana* und *L. usitatissimum* übertragen. Die Expression der CalDes cDNA stand dabei unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV 35 S-Promotors bzw. des samenspezifischen USP-Promotors.
- Als Expressionsvektoren wurden der Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science, 66, 1990: 221 - 230) bzw. das pBinAR Derivat pBinAR-USP, bei dem der CaMV 35 S-Promotor gegen den USP-Promotor aus *V. faba* ausgetauscht war, verwendet. Zur Umklonierung mußte die CalDes-cDNA aus dem Vektor pGEM-T ausgeschnitten werden. Dazu wurde zunächst mit NcoI geschnitten und mit Klenow zu glatten Enden aufgefüllt, anschließend wurde das Insert mit SalI herausgeschnitten und in die SmaI/SalI geschnittenen Vektoren pBinAR bzw. pBinAR-USP kloniert.
- Die entstandenen Plasmide pBinAR-CalDes bzw. pBinAR-USP-CalDes wurden in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert (Höfgen und Willmitzer, Nucl. Acids Res., 16, 1988: 9877). Die Transformation von *A. thaliana* erfolgte mittels "floral dip" (Clough und Bent, Plant Journal, 16, 1998: 735 - 743), die von *L. usitatissimum* durch Cokultivierung von Leinen-Hypokotylstücken mit transformierten *A. tumefaciens* Zellen.

## 26

Die Expression des CalDes-Gens in transgenen Arabidopsis und Linum Pflanzen wurde über Northern-Blot Analyse untersucht. Ausgewählte Pflanzen wurden auf ihren Gehalt an Calendulasäure im Samenöl untersucht.

5

Analog zum USP-Promotor kann auch der Napin-Promotor verwendet werden, um eine samenspezifische Expression von CalDes zu erreichen.

10

15



20

25

30



35

40

45

## 27

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Institut für Pflanzenbiochemie

<120> Fettsäure-Desaturase-Gen aus Pflanzen

<130> Sequenz\_Desaturase

<140> 50669

<141> 1999-08-31

<160> 2

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1285

<212> DNA

<213> Calendula officinalis

<220>

<221> CDS

<222> (42)..(1175)

<400> 1

aaaagctcac ttctctgtga gggtaattat atatcaacaa c atg ggt gct ggt ggt 56  
Met Gly Ala Gly Gly  
1 5

cgg atg tcg gat cca tct gag gga aaa aac atc ctt gaa cgt gtg cca 104  
Arg Met Ser Asp Pro Ser Glu Gly Lys Asn Ile Leu Glu Arg Val Pro  
10 15 20

gtc gat cca ccg ttc acg tta agc gat ctg aag aaa gcg att cct acc 152  
Val Asp Pro Pro Phe Thr Leu Ser Asp Leu Lys Lys Ala Ile Pro Thr  
25 30 35

cat tgc ttt gag cga tct gtc atc cgg tca tca tac tat gtt gtt cat 200  
His Cys Phe Glu Arg Ser Val Ile Arg Ser Ser Tyr Tyr Val Val His  
40 45 50

gat ctc att gtt gcc tat gtc ttc tac tac ctt gca aac acg tat atc 248  
Asp Leu Ile Val Ala Tyr Val Phe Tyr Tyr Leu Ala Asn Thr Tyr Ile  
55 60 65

cct ctt att cct aca cct ctg gct tac cta gca tgg ccc gtt tac tgg 296  
Pro Leu Ile Pro Thr Pro Leu Ala Tyr Leu Ala Trp Pro Val Tyr Trp  
70 75 80 85

ttt tgt caa gct agc atc ctc acc ggc ctc tgg gtc atc ggt cac gaa 344  
Phe Cys Gln Ala Ser Ile Leu Thr Gly Leu Trp Val Ile Gly His Glu



28

90

95

100

tgt ggt cac cat gca ttt agc gac tac cag ttg att gat gac att gtt 392  
Cys Gly His His Ala Phe Ser Asp Tyr Gln Leu Ile Asp Asp Ile Val  
105 110 115

gga ttc gtg ctc cat tcg gct ctc ctc acc ccg tat ttc tct tgg aaa 440  
Gly Phe Val Leu His Ser Ala Leu Leu Thr Pro Tyr Phe Ser Trp Lys  
120 125 130

tat agc cac agg aat cac cac gcc aac aca aat tca ctc gat aac gat 488  
Tyr Ser His Arg Asn His His Ala Asn Thr Asn Ser Leu Asp Asn Asp  
135 140 145

gaa gtt tac att cct aaa cgt aag tcg aag gtc aag att tat tcc aaa 536  
Glu Val Tyr Ile Pro Lys Arg Lys Ser Lys Val Lys Ile Tyr Ser Lys  
150 155 160 165

ctt ctt aac aat cca ccc ggg cga gtg ttc act ttg gtg ttt cgg ttg 584  
Leu Leu Asn Asn Pro Pro Gly Arg Val Phe Thr Leu Val Phe Arg Leu  
170 175 180

act tta gga ttt ccg tta tac ctc tta act aat atc tcg ggc aag aaa 632  
Thr Leu Gly Phe Pro Leu Tyr Leu Leu Thr Asn Ile Ser Gly Lys Lys  
185 190 195

tac ggg agg ttt gcc aac cac ttt gat ccc atg agt cca att ttc aac 680  
Tyr Gly Arg Phe Ala Asn His Phe Asp Pro Met Ser Pro Ile Phe Asn  
200 205 210

gat cgt gaa cgc gtt caa gtt ttg cta tcc gat ttc ggt ctt ctc gct 728  
Asp Arg Glu Arg Val Gln Val Leu Leu Ser Asp Phe Gly Leu Leu Ala  
215 220 225

gta ttt tat gca atc aag ctt ctt gta gca gca aaa ggg gca gct tgg 776  
Val Phe Tyr Ala Ile Lys Leu Leu Val Ala Ala Lys Gly Ala Ala Trp  
230 235 240 245

gta atc aac atg tac gca att cca gta cta ggt gta agc gtg ttc ttc 824  
Val Ile Asn Met Tyr Ala Ile Pro Val Leu Gly Val Ser Val Phe Phe  
250 255 260

gtt ttg atc aca tat ttg cac cac acc cat ctc tca ctc cct cat tat 872  
Val Leu Ile Thr Tyr Leu His His Thr His Leu Ser Leu Pro His Tyr  
265 270 275

gat tca acc gaa tgg aac tgg atc aaa ggc gcc tta tca aca atc gat 920  
Asp Ser Thr Glu Trp Asn Trp Ile Lys Gly Ala Leu Ser Thr Ile Asp  
280 285 290

agg gat ttc ggg ttc ctg aat cgg gtt ttc cac gac gtt aca cac act 968

## 29

Arg Asp Phe Gly Phe Leu Asn Arg Val Phe His Asp Val Thr His Thr  
295 300 305

cac gtc ttg cat cat ttg atc tca tac att cca cat tat cat gca aag 1016  
His Val Leu His His Leu Ile Ser Tyr Ile Pro His Tyr His Ala Lys  
310 315 320 325

gaa gca agg gat gca atc aag cca gtg ttg ggc gag tac tat aaa atc 1064  
Glu Ala Arg Asp Ala Ile Lys Pro Val Leu Gly Glu Tyr Tyr Lys Ile  
330 335 340

gac agg act cca att ttc aaa gca atg tat aga gag gct aag gaa tgc 1112  
Asp Arg Thr Pro Ile Phe Lys Ala Met Tyr Arg Glu Ala Lys Glu Cys  
345 350 355

atc tac atc gag ccc gat gag gat agc gag cac aaa ggt gtg ttc tgg 1160  
Ile Tyr Ile Glu Pro Asp Glu Asp Ser Glu His Lys Gly Val Phe Trp  
360 365 370

tac cac aag atg taa tcaaaaagggt gtatgtcaat gcaattgtat gcttaattaa 1215  
Tyr His Lys Met  
375

gttggttaaac tttctattcc gtgtaataaaa ttatcattaa gagaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1275

aaaaaaaaaa 1285

<210> 2

<211> 377

<212> PRT

<213> Calendula officinalis

<400> 2

Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Ser Asp Pro Ser Glu Gly Lys Asn Ile  
1 5 10 15

Leu Glu Arg Val Pro Val Asp Pro Pro Phe Thr Leu Ser Asp Leu Lys  
20 25 30

Lys Ala Ile Pro Thr His Cys Phe Glu Arg Ser Val Ile Arg Ser Ser  
35 40 45

Tyr Tyr Val Val His Asp Leu Ile Val Ala Tyr Val Phe Tyr Tyr Leu  
50 55 60

Ala Asn Thr Tyr Ile Pro Leu Ile Pro Thr Pro Leu Ala Tyr Leu Ala  
65 70 75 80

Trp Pro Val Tyr Trp Phe Cys Gln Ala Ser Ile Leu Thr Gly Leu Trp  
85 90 95

30

Val Ile Gly His Glu Cys Gly His His Ala Phe Ser Asp Tyr Gln Leu  
100 105 110

Ile Asp Asp Ile Val Gly Phe Val Leu His Ser Ala Leu Leu Thr Pro  
115 120 125

Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Asn His His Ala Asn Thr Asn  
130 135 140

Ser Leu Asp Asn Asp Glu Val Tyr Ile Pro Lys Arg Lys Ser Lys Val  
145 150 155 160

Lys Ile Tyr Ser Lys Leu Leu Asn Asn Pro Pro Gly Arg Val Phe Thr  
165 170 175

Leu Val Phe Arg Leu Thr Leu Gly Phe Pro Leu Tyr Leu Leu Thr Asn  
180 185 190

Ile Ser Gly Lys Lys Tyr Gly Arg Phe Ala Asn His Phe Asp Pro Met  
195 200 205

Ser Pro Ile Phe Asn Asp Arg Glu Arg Val Gln Val Leu Leu Ser Asp  
210 215 220

Phe Gly Leu Leu Ala Val Phe Tyr Ala Ile Lys Leu Leu Val Ala Ala  
225 230 235 240

Lys Gly Ala Ala Trp Val Ile Asn Met Tyr Ala Ile Pro Val Leu Gly  
245 250 255

Val Ser Val Phe Phe Val Leu Ile Thr Tyr Leu His His Thr His Leu  
260 265 270

Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Thr Glu Trp Asn Trp Ile Lys Gly Ala  
275 280 285

Leu Ser Thr Ile Asp Arg Asp Phe Gly Phe Leu Asn Arg Val Phe His  
290 295 300

Asp Val Thr His Thr His Val Leu His His Leu Ile Ser Tyr Ile Pro  
305 310 315 320

His Tyr His Ala Lys Glu Ala Arg Asp Ala Ile Lys Pro Val Leu Gly  
325 330 335

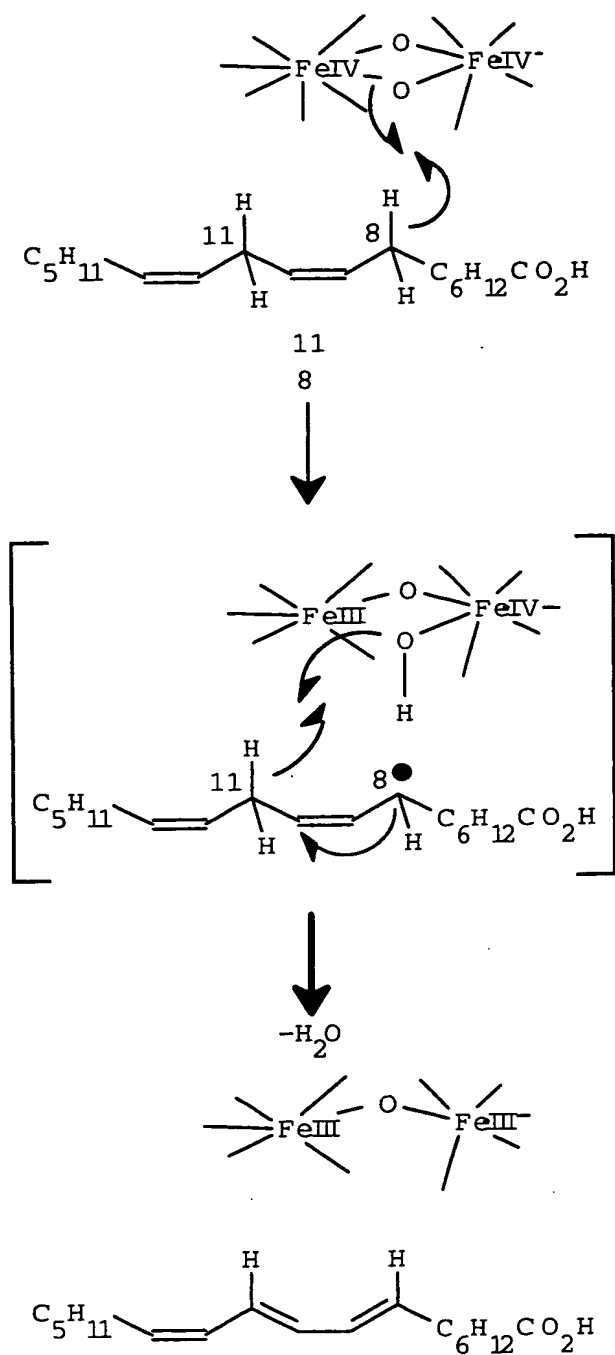
Glu Tyr Tyr Lys Ile Asp Arg Thr Pro Ile Phe Lys Ala Met Tyr Arg  
340 345 350

Glu Ala Lys Glu Cys Ile Tyr Ile Glu Pro Asp Glu Asp Ser Glu His  
355 360 365

31

Lys Gly Val Phe Trp Tyr His Lys Met  
370 375

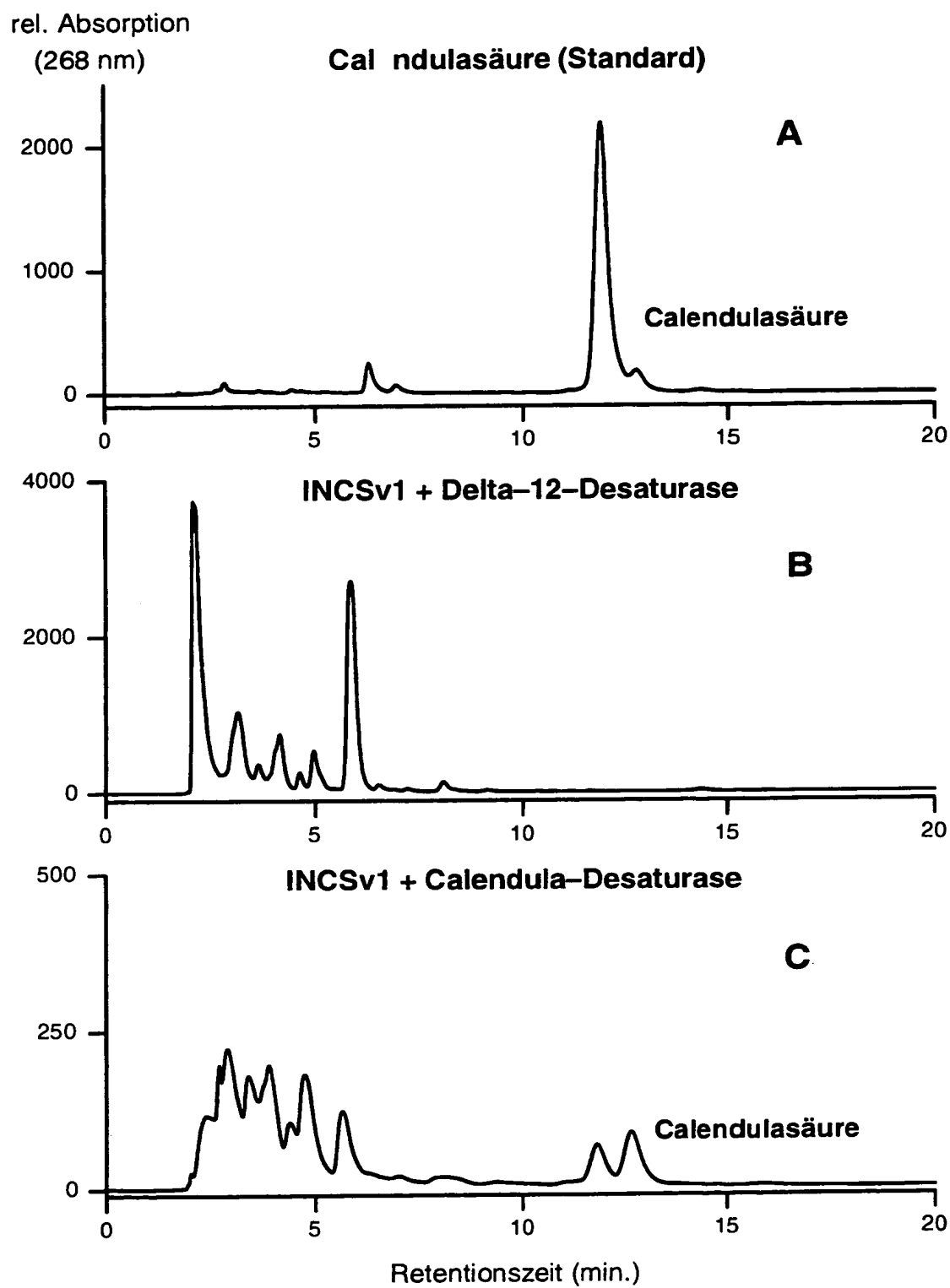
Figur 1



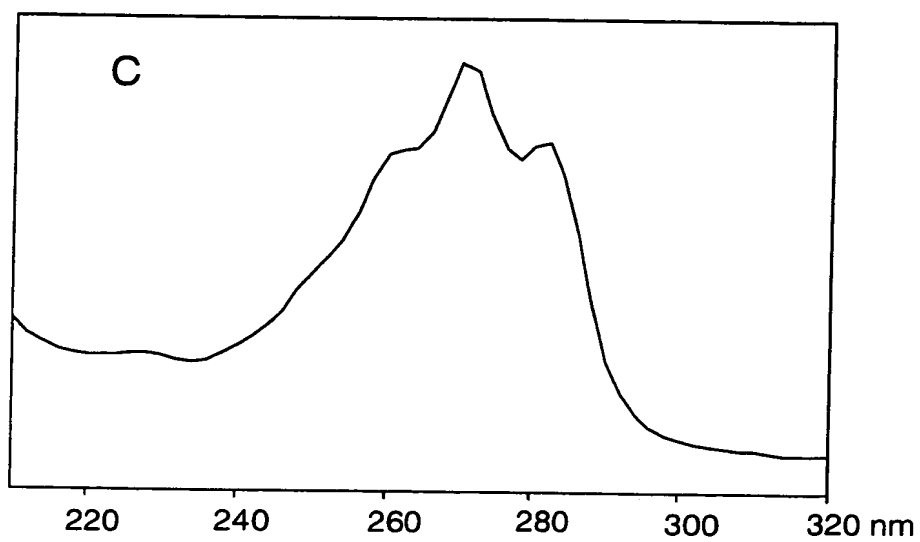
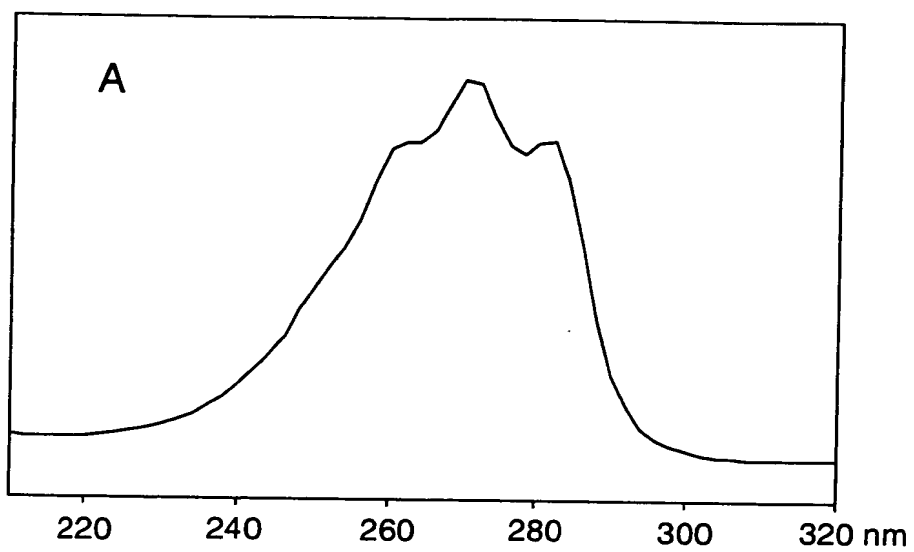
Figur 2

	1					50
Co-CalDes	MGAGGRMSDP	SEGK....NI	LERVPVDP.P	FTLSDLKKAI	PTHCFERSVI	
Ca-Acetyl	MGGGGR.GRT	SQ.K....PL	MERVSVDP.P	FTVSDLKQAI	PPHCFKRSVI	
Cp-Epoxy	MGAGGR.GRT	SE.K....SV	MERVSVDPVT	FSLSELKQAI	PPHCFQRSVI	
Bo-Des	MGGGGRMPVP	TKGKSKSDV	FQRPVSEKPP	FTVGDLLKKVI	PPHCFQRSVL	
	51					100
Co-CalDes	RSSYYVVHDL	IVAYVFYYLA	NTYIPLIPTP	LAYLAWPVYW	FCQASILTGL	
Ca-Acetyl	RSSYYIVHDA	IIAYIFYFLA	DKYIPILPAP	LAYLAWPLYW	FCQASILTGL	
Cp-Epoxy	RSSYYVVQDL	IIAYIFYFLA	NTYIPTLPTS	LAYLAWPVYW	FCQASVLTGL	
Bo-Des	HSFSYVVYDL	VIAALFFYTA	SRYIHLQPHP	LSYVAWPLYW	FCQGSVLTGV	
	101					150
Co-CalDes	WVIGHECGHH	AFSDYQLIDD	IVGFVLHSAL	LTPYFSWKYS	HRNHANTNS	
Ca-Acetyl	WVIGHECGHH	AFSDYQWDD	TVGFILHSFL	MTPYFSWKYS	HRNHANTNS	
Cp-Epoxy	WILGHECGHH	AFSNYTWFD	TVGFILHSFL	LTPYFSWKFS	HRNHHSNTSS	
Bo-Des	WVIAHECGHH	AFSDYQWLDD	TVGLLLHSAL	LVPYFSWKYS	HRRHHSNTGS	
	151					200
Co-CalDes	LDNDEVYIPK	RKSKVKIYK	LLNNPPGRVF	TLVFRLTLGF	PLYLLTNISG	
Ca-Acetyl	LDNDEVYIPK	SKAKVALYK	VLNHPGRLL	IMFITFTLGF	PLYLFTNISG	
Cp-Epoxy	IDNDEVYIPK	SKSKLARIYK	LLNNPPGRLL	VLIIMFTLGF	PLYLLTNISG	
Bo-Des	LERDEVFVPK	KRSGISWSSE	YLNNPPGRVL	VLLVQLTLGW	PLYLMFNVSG	
	201					250
Co-CalDes	KKYGRFANHF	DPMSPIFNDR	ERVQVLLSDF	GLLAVFYAIK	LLVAAKGAAW	
Ca-Acetyl	KKYERFANHF	DPMSPIFKER	ERFQVLLSDL	GLLAVLYGVK	LVAACKGAAW	
Cp-Epoxy	KKYDRFANHF	DPMSPIFKER	ERFQVFLSDL	GLLAVFYGIK	VAVANKGAAW	
Bo-Des	RPYDRFACHF	DPKSPIYNDR	ERLQIYISDA	GIVAVMYGLY	RLVAAKGVAW	
	251					300
Co-CalDes	VINMYAIPVL	GVSVFFVLIT	YLHHTHLSLP	HYDSTEWNWI	KGALSTIDRD	
Ca-Acetyl	VTCIYGIPVL	GVFIFFDIIT	YLHHTHLSLP	HYDSSEWNWL	RGALSTIDRD	
Cp-Epoxy	VACMYGVPVL	GVFTFFDVIT	FLHHTHQSSP	HYDSTEWNWI	RGALSAIDRD	
Bo-Des	VVCYGVPLL	VVNGFLVLIT	YLQHTQPSLP	HYDSSEWDWL	KGALATVDRD	
	301					350
Co-CalDes	FGFLNRVFDH	VTHTHVLHHL	ISYIPHYHAK	EARDAIKPVL	GEYYKIDRTP	
Ca-Acetyl	FGFLNSVLHD	VTHTHVMHHL	FSYIPHYHAK	EARDAINTVL	GDFYKIDRTP	
Cp-Epoxy	FGFLNSVFDH	VTHTHVMHHL	FSYIPHYHAK	EARDAIKPIL	GDFYMIDRTP	
Bo-Des	YGFLNKVLHN	ITDTHVAHHL	FSTMPHYHAM	EATKAIKPIL	GDYYQCDRTP	
	351					384
Co-CalDes	IFKAMYREAK	ECIYIEPDED	SEHKGVFVWY.	HKM*		
Ca-Acetyl	ILKAMWREAK	ECIFIEPEKG	RESKGVVWY.	NKF*		
Cp-Epoxy	ILKAMWREGR	ECMYIEPDS.	.KLKGVVWY.	HKL*		
Bo-Des	VFKAMYREVK	ECIYVEADEG	DNKKGVFVWYK	NKL*		

Figur 3



Figur 4





## Fettsäure-Desaturase-Gen aus Pflanzen

## Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren.

10

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Nukleinsäuresequenz; ein Nukleinsäurekonstrukt, einen Vektor und Organismen enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz bzw. ein Nukleinsäurekonstrukt. Außerdem betrifft die Erfindung gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt

an ungesättigten oder gesättigten Fettsäuren und deren Verwendung.

20

25

30

35

40

45

